

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/IT05/000088

International filing date: 17 February 2005 (17.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: IT

Number: RM2004A000098

Filing date: 25 February 2004 (25.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 21 April 2005 (21.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

IT 05/88



Ministero delle Attività Produttive

Direzione Generale per lo Sviluppo Produttivo e la Competitività

Ufficio Italiano Brevetti e Marchi

Ufficio G2

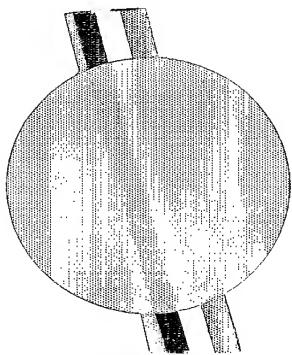


Autenticazione di copia di documenti relativi alla domanda di brevetto per:
INVENZIONE INDUSTRIALE N. RM 2004 A 000098

Si dichiara che l'unità copia è conforme ai documenti originali
depositati con la domanda di brevetto sopra specificata, i cui dati
risultano dall'accluso processo verbale di deposito.

L 4 APR. 2005

Roma, li.....



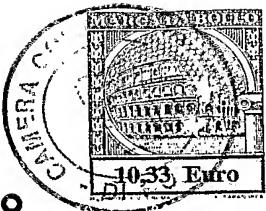
IL FUNZIONARIO
Ing. Giovanni de Sanctis
[Signature]

MODULO A (1/2)

AL MINISTERO DELLE ATTIVITA' PRODUTTIVE
UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI (U.I.B.M.)

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE N°

HM 2004 A 000098



A. RICHIEDENTE/I

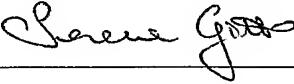
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1 UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI ROMA "TOR VERGATA"		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2 PG	COD.FISCALE PARTITA IVA	A3 02133971008
INDIRIZZO COMPLETO	A4 VIA ORAZIO RAIMONDO 18 - 00173 ROMA, RM		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	COD.FISCALE PARTITA IVA	A3
INDIRIZZO COMPLETO	A4		
B. RECAPITO OBBLIGATORIO IN MANCANZA DI MANDATARIO	B0 (D = DOMICILIO ELETTIVO, R = RAPPRESENTANTE)		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	B1		
INDIRIZZO	B2		
CAP / LOCALITA' / PROVINCIA	B3		
C. TITOLO	C1 Anticorpi oligoclonali anticlasterina per la diagnosi di neoplasie e la predizione del loro grado di malignità, metodo diagnostico e kit relativi.		



D. INVENTORE/I DESIGNATO/I (DA INDICARE ANCHE SE L'INVENTORE COINCIDE CON IL RICHIEDENTE)

COGNOME E NOME	D1 SPAGNOLI LUIGI GIUSTO		
NAZIONALITA'	D2		
COGNOME E NOME	D1 BONANNO ELENA		
NAZIONALITA'	D2		
COGNOME E NOME	D1 PUCCI SABINA		
NAZIONALITA'	D2		
COGNOME E NOME	D1 PICHIORRI FLAVIA		
NAZIONALITA'	D2		

E. CLASSE PROPOSTA	SEZIONE	CLASSE	SOTTOCLASSE	GRUPPO	SOTTOGRUPPO
	E1	E2	E3	E4	E5

F. PRIORITA'					
DERIVANTE DA PRECEDENTE DEPOSITO ESEGUITO ALL'ESTERO					
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1			TIPO	F2
	F3				
NUMERO DOMANDA				DATA DEPOSITO	F4
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1			TIPO	F2
	F3				
NUMERO DOMANDA				DATA DEPOSITO	F4
G. CENTRO ABILITATO DI RACCOLTA COLTURE DI MICROORGANISMI	G1				
FIRMA DEL / DEI RICHIEDENTE / I	 UN MANDATARIO per se e per gli altri Serena Gitto (N° d'iscr. 962 B)				

MODULO A (2/2)

I. MANDATARIO DEL RICHIEDENTE PRESSO L'UIBM

LA/E SOTTOINDICATA/E PERSONA/E HA/HANNO ASSUNTO IL MANDATO A RAPPRESENTARE IL TITOLARE DELLA PRESENTE DOMANDA INNANZI ALL'UFFICIO ITALIANO BREVETTI E MARCHI CON L'INCARICO DI EFFETTUARE TUTTI GLI ATTI AD ESSA CONNESSI, CONSAPEVOLE/I DELLE SANZIONI PREVISTE DALL'ART.76 DEL D.P.R. 28/12/2000 N.455.

NUMERO ISCRIZIONE ALBO COGNOME E NOME:	I1 453 BANCHETTI MARINA; 962B GITTO SERENA; 456 IANNONE CARLO LUIGI; 1012B SANTI FILIPPO; 963B SCILLETTA ANDREA; 171 TALIERCIO ANTONIO; 376 ZANARDO GIOVANNI;
DENOMINAZIONE STUDIO	I2 Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.
INDIRIZZO	I3 Via Piemonte 26
CAP / LOCALITA' / PROVINCIA	I4 00187 Roma
L. ANNOTAZIONI SPECIALI	L1 LETTERA D'INCARICO: RISERVA

M. DOCUMENTAZIONE ALLEGATA O CON RISERVA DI PRESENTAZIONE

TIPO DOCUMENTO	N.ES.ALL.	N.ES.RIS.	N.PAG.PER ESEMPLARE
PROSPETTO A, DESCRIZ. RIVENDICAZ. (OBBLIGATORI 2 ESEMPLARI)	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> 44
DISEGNI (OBBLIGATORI SE CITATI IN L. ANNOTAZIONI) (2 ESEMPLARI)	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/> 2
DESIGNAZIONE D'INVENTORE	<input type="checkbox"/> 1	<input type="checkbox"/>	
DOCUMENTI DI PRIORITA' CON TRADUZIONE IN ITALIANO	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
AUTORIZZAZIONE O ATTO DI CESSIONE	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	(SI/NO)		
LETTERA D'INCARICO	<input type="checkbox"/> SI		
PROCURA GENERALE	<input type="checkbox"/> NO		
RIFERIMENTO A PROCURA GENERALE	<input type="checkbox"/> NO		

ATTESTATI DI VERSAMENTO	IMPORTO VERSATO ESPRESSO IN LETTERE		
FOGLIO AGGIUNTIVO PER I SEGUENTI PARAGRAFI (BARRARE I PRESCELTI)	EURO DUECENTONOVANTUNO/80		
DEL PRESENTE ATTO SI CHIEDE COPIA AUTENTICA? <input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> A	<input checked="" type="checkbox"/> D	<input type="checkbox"/> X
SI CONCEDE ANTICIPATA ACCESSIBILITA' AL PUBBLICO? <input type="checkbox"/> NO	<input type="checkbox"/> SI	<input type="checkbox"/> F	<input type="checkbox"/>
DATA DI COMPILAZIONE	25/02/2004		

FIRMA DEL/DEI
RICHIEDENTE/I

*UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Serena Gitto
(N° d'iscr. 962B)*

VERBALE DI DEPOSITO			
NUMERO DI DOMANDA	RIV 2004 A 0000 98		
C.C.I.A.A. DI	ROMA COD. 58		
IN DATA	25/02/2004	IL/I RICHIEDENTE/I SOPRAINDICATO/I HA/HANNO PRESENTATO A ME SOTTOSCRITTO	
LA PRESENTE DOMANDA, CORREDATA DI N.	01	FOGLI AGGIUNTIVI, PER LA CONCESSIONE DEL BREVETTO SOPRA RIPORTATO.	
N. ANNOTAZIONI VARIE DELL'UFFICIO ROGANTE			

IL DEPOSITANTE		L'UFFICIALE ROGANTE L'Ufficiale Rogante Vanessa Di Burdolomeo

FOGLIO AGGIUNTIVO MODULO A
RM 2004 A 000098

DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE N° _____

FOGLIO AGGIUNTIVO N. **1**
 DI TOTALI: **1**

A. RICHIEDENTE/I

COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	COD.FISCALE PARTITA IVA	A3
INDIRIZZO COMPLETO	A4		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	COD.FISCALE PARTITA IVA	A3
INDIRIZZO COMPLETO	A4		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	COD.FISCALE PARTITA IVA	A3
INDIRIZZO COMPLETO	A4		
COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE	A1		
NATURA GIURIDICA (PF / PG)	A2	COD.FISCALE PARTITA IVA	A3
INDIRIZZO COMPLETO	A4		

D. INVENTORE/I DESIGNATO/I

COGNOME E NOME	D1 CITRO GENNARO		
NAZIONALITA'	D2		
COGNOME E NOME	D1		
NAZIONALITA'	D2		
COGNOME E NOME	D1		
NAZIONALITA'	D2		
COGNOME E NOME	D1		
NAZIONALITA'	D2		
COGNOME E NOME	D1		
NAZIONALITA'	D2		

DERIVANTE DA PRECEDENTE DEPOSITO ESEGUITO ALL'ESTERO

STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO F2	DATA DEPOSITO F4
	F3			
NUMERO DOMANDA	F1		TIPO F2	DATA DEPOSITO F4
	F3			
STATO O ORGANIZZAZIONE	F1		TIPO F2	DATA DEPOSITO F4
	F3			
NUMERO DOMANDA	F1		TIPO F2	DATA DEPOSITO F4
	F3			
FIRMA DEL / DEI RICHIEDENTE / I	<i>Serena Gitto</i>		UN MANDATARIO <i>per se e per gli altri</i> Serena Gitto (N° d'iscr. 962 B)	



PROSPETTO MODULO A
DOMANDA DI BREVETTO PER INVENZIONE INDUSTRIALE

NUMERO DI DOMANDA **RM 200 4 A 000098** DATA DI DEPOSITO: **25 Febbraio 2004**

A. RICHIEDENTE/I COGNOME E NOME O DENOMINAZIONE, RESIDENZA O STATO:

**Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"
Via Orazio Raimondo, 18 – 00173 Roma (RM), ITALIA**

C. TITOLO

"Anticorpi oligoclonali anticlasterina per la diagnosi di neoplasie e la predizione del loro grado di malignità, metodo diagnostico e kit relativi".

SEZIONE

CLASSE

SOTTOCLASSE

GRUPPO

SOTTOGRUPPO

E. CLASSE PROPOSTA

<input type="checkbox"/>				
--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------	--------------------------

O. RIASSUNTO

L'invenzione concerne anticorpi oligoclonali anticlasterina in grado di riconoscere e legare in maniera selettiva e specifica epitopi antigenici delle isoforme della clasterina da impiegare nella diagnosi di neoplasie e nella predizione del loro grado di malignità, metodo diagnostico e kit relativi.

P. DISEGNO PRINCIPALE

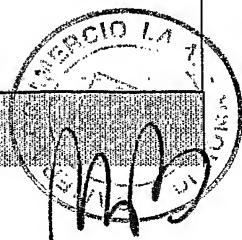


FIRMA DEL / DEI
RICHIEDENTE / I



UN MANDATARIO
per sé e per gli altri

**Serena Gitto
(N° d'iscr. 962 B)**



RM 2004 A 000098

DESCRIZIONE

a corredo di una domanda di brevetto per invenzione industriale dal titolo: "Anticorpi oligoclonali anticlasterina per la diagnosi di neoplasie e la predizione del loro grado di malignità, metodo diagnostico e kit relativi"

Titolare: Universita' degli Studi di Roma "Tor Vergata"

Inventori: Luigi Giusto SPAGNOLI, Elena BONANNO, Sabina PUCCI, Flavia PICHIORRI, Gennaro CITRO

* * *

La presente invenzione concerne anticorpi oligoclonali anticlasterina per la diagnosi di neoplasie e la predizione del loro grado di malignità, metodo diagnostico e kit relativi.

Più in particolare, l'invenzione si riferisce ad anticorpi oligoclonali anticlasterina selettivi e specifici per la diagnosi di insorgenza o di recidiva di neoplasie e per la predizione del loro grado di malignità quali, ad esempio, il carcinoma al colon-retto e alla mammella, della prostata, del testicolo, dell'ovaio, neoplasie del sistema nervoso centrale, del sistema emolinfopoietico.

Attualmente, il cancro del grosso intestino è la neoplasia maligna seconda per incidenza e

mortalità solo al tumore del polmone negli uomini e al cancro della mammella nelle donne nei paesi occidentali.

Nel nostro paese si registra un'incidenza di circa 40 nuovi casi ogni 100.000 abitanti (circa 30.000 nuovi casi per anno) ed una mortalità stimata attorno ai 18.000 decessi ogni anno.

Il picco d'incidenza per fascia d'età della neoplasia si osserva mediamente tra la sesta e la settima decade di vita, mentre la sopravvivenza media a cinque anni si colloca attualmente intorno al 60%.

La ragione fondamentale della bassa percentuale di guarigione sta nel fatto che, al momento della resezione del tumore primitivo, una quota significativa di pazienti ha già sviluppato micrometastasi principalmente a livello epatico.

Appare quindi di grande importanza la disponibilità di metodiche di screening precoce. Attualmente, i protocolli di diagnosi precoce (prevenzione secondaria) consistono nella esplorazione rettale, nella determinazione del sangue occulto nelle feci, nella rettosigmoidoscopia o pancolonoscopia, periodicamente attuati su soggetti con età media superiore ai quarantacinque anni e asintomatici. La pancolonoscopia eseguita

ASSEGNAZIONE
DI TUMORES
DEL COLON
E RETTO

periodicamente è di fatto l'unica procedura in grado di diagnosticare precocemente la neoplasia in soggetti appartenenti alla cosiddetta "popolazione a rischio", cioè soggetti con anamnesi familiare positiva per carcinoma del colon retto, pazienti con pregressa neoplasia o affetti da sindrome ad alto rischio di neoplasia.

La possibilità di ottenere informazioni aggiuntive sulle alterazioni molecolari di una neoplasia presenta il vantaggio irrinunciabile rappresentato dal fatto di poter stratificare il gruppo di pazienti affetti dalla neoplasia in sottogruppi di prognosi differente e quindi indirizzarli verso protocolli terapeutici più adeguati. Inoltre, la stessa alterazione molecolare può rappresentare il target di una terapia mirata, permettendo di rivoluzionare radicalmente la terapia farmacologica del cancro.

Studi recenti hanno dimostrato un aumento dell'espressione di clasterina nel tumore della mammella (Redondo et al, 2000), suggerendo un suo probabile ruolo nella progressione tumorale.

La clasterina è una glicoproteina eterodimerica (catene α e β) ubiquitaria implicata in diversi processi fisiologici e nel controllo della

BIBLIOGRAFIA

proliferazione cellulare (Murphy et al., 1988; Aronow et al., 1993; Fratelli et al., 1996; Ho et al., 1998; Humphreys et al., 1999; O'Sullivan et al., 2003; Zhou et al., 2002; Bettuzzi et al., 2002). Sono state caratterizzate diverse isoforme che differiscono per il grado di glicosilazione e per la funzione mediata.

Gli autori della presente invenzione in un lavoro recentemente pubblicato (Pucci et al., 2004) hanno studiato l'espressione della clasterina al fine di delucidare il suo ruolo nella progressione tumorale ed in particolare nella sequenza adenoma-carcinoma del colon-retto, uno dei modelli di tumorigenesi più studiati e meglio definiti nell'uomo. In questo contesto, l'osservazione di 35 campioni di mucosa intestinale umana, quali biopsie endoscopiche e prelievi chirurgici, ha dimostrato la presenza di una modulazione delle differenti isoforme di clasterina nei differenti compartimenti cellulari, direttamente correlata alla progressione tumorale. Infatti, è stata riscontrata la presenza di clasterina a localizzazione esclusivamente nucleare con la funzione di regolazione della progressione del ciclo cellulare e induzione dell'apoptosi nella mucosa sana del colon. Invece, nel processo di



cancerizzazione e di progressione della neoplasia sono stati osservati un marcato aumento di espressione della proteina esclusivamente nel citoplasma e assenza dell'isoforma nucleare.

Le evidenze concernenti la localizzazione hanno permesso di riconoscere due principali isoforme: una isoforma nucleare non glicosilata presente nella mucosa sana e negli adenomi; una isoforma citoplasmatica glicosilata assente nella mucosa sana ed altamente espressa nel citoplasma delle cellule neoplastiche. Tali risultati concernenti la modulazione di differenti isoforme di clasterina nella tumorigenesi del colon-retto chiariscono i dati controversi sull'aumento di clasterina descritto nelle neoplasie e sul ruolo della proteina nell'induzione dell'apoptosi, suggerendo un possibile ruolo della clasterina come potenziale nuovo marcatore di insorgenza e di prognosi del cancro del colon-retto.

L'impiego della clasterina come indice diagnostico di certe condizioni fisio-patologiche, quali, ad esempio, il diabete mellito di tipo II ed alcune patologie coronariche è stato già descritto nella domanda di brevetto greco GR 20020100196. Il documento greco descrive un metodo ELISA che si

avvale di due anticorpi disponibili commercialmente (uno dei quali è coniugato con l'enzima HRP) per la misurazione quantitativa dei livelli di ApoJ sierica correlati alle condizioni patologiche summenzionate. In particolare, nel documento l'unico riferimento a patologie tumorali riguarda la citazione di un precedente tentativo non soddisfacente di misurazione mediante ELISA di ApoJ nel sangue dei pazienti affetti da carcinoma alla prostata (Morrisey et al., 2001).

Alla luce di quanto sopra esposto, risulta evidente l'esigenza di potere disporre di nuovi mezzi e metodi per la diagnosi e la predizione del grado di malignità e della stadiazione clinica di alcune neoplasie, in particolare del colon-retto, che consentano di superare i limiti delle metodiche invasive attualmente impiegate.

Gli autori della presente invenzione hanno ora evidenziato che la comparsa ed il progressivo aumento dell'isoforma citoplasmatica della clasterina nelle neoplasie è correlata ad un significativo incremento di clasterina nel siero dei pazienti affetti da patologie tumorali ed, in particolare, da carcinoma del colon-retto.

Sulla base di questa osservazione, gli autori hanno messo a punto un nuovo metodo di immunodosaggio della clasterina mediante anticorpi in grado di riconoscere in maniera specifica e selettiva le due isoforme di clasterina, citoplasmatica e nucleare, per la diagnosi di quelle alterazioni molecolari che nell'ambito dello studio dei tumori consentono di definire la prognosi e dare indicazioni terapeutiche.

Infatti, come precedentemente descritto, la scomparsa dell'isoforma nucleare di clasterina non glicosilata e l'espressione preferenziale di una seconda isoforma totalmente glicosilata e citoplasmatica sembrano essere direttamente correlate all'aggressività del tumore e al suo potenziale metastatico (Pucci et al., 2004).

In particolare, detto metodo di dosaggio delle due isoforme di clasterina citoplasmatica e nucleare mediante gli anticorpi secondo la presente invenzione oltre a rappresentare un mezzo non invasivo, semplice ed economico per il follow-up dei pazienti consente di formulare un indice di aggressività biologica della neoplasia consentendo quindi una standardizzazione di detto metodo. In particolare, gli autori hanno messo a punto una curva standard in cui la proteina di riferimento non consiste nella

forma purificata della proteina clasterina ma nel peptide sintetizzato in base al nuovo epitopo scelto per l'immunizzazione.

Le tecniche sierologiche ad oggi utilizzate, ELISA e/o immunofluorescenza, richiedono l'impiego di anticorpi monoclonali per la difficoltà di ottenere sieri specifici.

Gli autori della presente invenzione hanno ora ottenuto sieri specifici contenenti anticorpi oligoclonali specifici e selettivi per determinati epitopi appartenenti alle isoforme di clasterina, citoplasmatica e nucleare. Questi anticorpi oligoclonali non presentano gli svantaggi in termini di riproducibilità, costi di produzione e conservazione tipici degli anticorpi monoclonali ottenuti a partire da un ibridoma. Infatti, la selezione e la conservazione di un ibridoma presenta numerosi limiti: la bassa riproducibilità del clone e della specificità antincorpale verso l'epitopo, la difficoltà tecnica per la produzione dell'ibridoma, il costo elevato per il mantenimento e la difficile conservazione di campioni inalterati nel tempo.

Inoltre, la procedura di produzione degli anticorpi oligoclonali secondo l'invenzione si basa sulla scelta di epitopi antigenici molto piccoli



sintetizzati su fase solida che consente di determinare un repertorio ristretto di anticorpi assimilabile ad un anticorpo monoclonale per quanto concerne le caratteristiche di specificità e affinità. Per una maggiore facilità di impiego degli anticorpi oligoclonali secondo l'invenzione, le sequenze degli epitopi antigeniche sono state scelte tra quelle altamente conservate anche nel modello murino (90%) che consentono un più vasto campo applicativo con estensione d'uso anche nei modelli animali utilizzati per la ricerca e tali da minimizzare il legame aspecifico con le altre proteine umane diverse dalla clasterina. In aggiunta, la scelta di detti epitopi è stata condotta dagli autori della presente invenzione sia per garantire la massima specificità ed efficienza e la minima cross-reattività dell'anticorpo oligoclonale con le diverse isoforme glicosilate della clasterina citoplasmatica, sia per ottenere anticorpi altamente specifici e selettivi per l'isoforma nucleare non glicosilata.

E' da evidenziare il fatto che gli anticorpi anticlesterina in commercio non sono in grado di identificare detta isoforma nucleare perché l'immunizzazione eseguita per la loro preparazione avviene somministrando le proteine purificate dal

siero, che gli stessi autori hanno recentemente dimostrato contenere esclusivamente l'isoforma glicosilata della proteina.

Nel caso specifico dello studio condotto sul carcinoma del colon-retto, gli autori della presente invenzione hanno trovato che l'isoforma di clasterina citoplasmatica secreta viene rilasciata nello spazio extracellulare e nel lume dell'intestino per cui è previsto un incremento della proteina anche nelle feci dei pazienti affetti dalla patologia. Quindi, il dosaggio di clasterina può essere effettuato, oltre che nel sangue periferico, nelle feci anche con un test crociato sangue-feci altamente specifico per il carcinoma del colon-retto. In tal modo si elimina il problema dell'eventuale interferenza di incrementi dei livelli di clasterina dovuti ad altre neoplasie (neoplasie alla mammella, prostata, testicolo, ovaio, sistema nervoso centrale, sistema emolinfopoietico).

Formano pertanto oggetto della presente invenzione anticorpi oligoclonali in grado di riconoscere e legare in maniera selettiva e specifica l'epitopo antigenico di almeno un'isoforma di clasterina, detto epitopo essendo caratterizzato da una lunghezza della sequenza amminoacidica compresa tra 10 e 20 amminoacidi. Detta almeno un'isoforma,

che gli anticorpi oligoclonali anticlasterina sono in grado di riconoscere e legare, può essere l'isoforma della clasterina citoplasmatica glicosilata o l'isoforma della clasterina nucleare non glicosilata. In questo senso gli anticorpi oligoclonali secondo la presente invenzione sono in grado di discriminare tra le diverse isoforme di clasterina esistenti.

Più in particolare, l'epitopo antigenico scelto per generare detti anticorpi oligoclonali contro l'isoforma nucleare non glicosilata della clasterina può comprendere una sequenza amminoacidica scelta dal gruppo che consiste in:

QFNWVSRLANLTQGEDQK (SEQ ID No 1);

TKLKELPGVCNETMMALWEE (SEQ ID No 2);

e loro derivati ottenuti mediante delezione, addizione o sostituzione di uno o più amminoacidi che mantengono le stesse proprietà immunogeniche dell'epitopo antigenico di partenza.

L'epitopo antigenico scelto per generare detti anticorpi oligoclonali contro l'isoforma citoplasmatica glicosilata della clasterina può comprendere una sequenza amminoacidica scelta dal gruppo che consiste in:

TKLKELPGVCNETMMALWEE (SEQ ID No 2);

TNEERKTLLSNLEAK (SEQ ID No 3);



METVAEKALQEYRKK (SEQ ID No 4);

e loro derivati ottenuti mediante delezione, addizione o sostituzione di uno o più amminoacidi che mantengono le stesse proprietà immunogeniche dell'epitopo antigenico di partenza.

Gli anticorpi oligoclonali secondo la presente invenzione possono essere marcati, preferibilmente con un fluorocromo, un isotopo radioattivo, un enzima, biotina o una sostanza chemioluminescente.

In particolare, il fluorocromo può essere la fluoresceina, la ficoeritrina, la rodamina, il texas red, la cumarina; l'enzima può essere la perossidasi di rafano (HRP), la fosfatasi alcalina; l'isotopo radioattivo può essere il ^{14}C o il ^3H ; la sostanza chemioluminescente può essere la luciferina.

Costituiscono ulteriore oggetto della presente invenzione epitopi antigenici appartenenti ad almeno un'isoforma della clasterina, citoplasmatica e/o nucleare, comprendente almeno una sequenza amminoacidica scelta dal gruppo che consiste in:

QFNWVSRLANLTQGEDQK (SEQ ID No 1);

TKLKELPGVCNETMMALWEE (SEQ ID No 2);

TNEERKTLLSNLEEK (SEQ ID No 3);

METVAEKALQEYRKK (SEQ ID No 4);

e loro derivati ottenuti mediante delezione, addizione o sostituzione di uno o più amminoacidi che mantengono le stesse proprietà immunogeniche dell'epitopo antigenico di partenza.

Ulteriore oggetto della presente invenzione è rappresentato da un metodo per la preparazione degli anticorpi oligoclonali, come definiti precedentemente, comprendente le seguenti fasi:

- a) sintesi in fase solida di almeno uno degli epitopi antigenici come sopra definiti;
- b) coniugazione di detto almeno un epitopo antigenico con un carrier proteico atto a rendere immunogeno detto epitopo, preferibilmente albumina di siero bovina;
- c) immunizzazione dell'animale con detto epitopo reso immunogeno, in adiuvante di Freund completo;
- d) prelievo del siero da detto animale, preferibilmente dal coniglio, e purificazione degli anticorpi oligoclonali, ad esempio, mediante chromatografia di affinità.

Forma ulteriore oggetto della presente invenzione un metodo immunologico per la rivelazione dei livelli di clasterina in un campione biologico per la diagnosi di neoplasie e per la predizione del

loro grado di malignità comprendente le seguenti fasi:

- a) estrazione delle proteine da detto campione biologico, quale , ad esempio, sangue, feci, liquido seminale, liquido pleurico, liquido ascetico, urine, liquor;
- b) incubazione in opportune condizioni di detto estratto proteico con almeno un anticorpo oligoclonale come sopra descritto, in maniera da formare un complesso antigene-anticorpo; e
- c) rivelazione qualitativa e quantitativa di detto complesso antigene-anticorpo.

Più in particolare, il metodo immunologico secondo la presente invenzione consente la diagnosi di neoplasie quali, ad esempio, carcinoma del colon-retto, della mammella, della prostata, del testicolo, dell'ovaio, neoplasie del sistema nervoso centrale, del sistema emolinfopoietico.

La rivelazione della fase c) può essere eseguita mediante almeno una delle tecniche scelte dal gruppo che consiste in ELISA, Western Blot, RIA, immunoistochimica rivelata con fluorocromi (immunofluorescenza) o con metodo enzimatico, o mediante una combinazione di dette tecniche.

Costituisce ulteriore oggetto della presente

invenzione un kit diagnostico per la diagnosi di neoplasie e per la predizione del loro grado di malignità comprendente almeno uno degli anticorpi oligoclonali secondo la presente invenzione. Le neoplasie che possono essere diagnosticate sono, ad esempio, il carcinoma del colon-retto, della mammella, della prostata, del testicolo, dell'ovaio, neoplasie del sistema nervoso centrale, del sistema emolinfopoietico.

Infine, un ulteriore oggetto della presente invenzione è rappresentato dall'uso di almeno uno degli anticorpi oligoclonali secondo l'invenzione, per la determinazione qualitativa e quantitativa dei livelli di almeno un'isoforma di clasterina in un campione biologico quale, ad esempio, sangue, feci, liquido seminale, liquido pleurico, liquido ascetico, urine, liquor, per la diagnosi di neoplasie e per la predizione del loro grado di malignità quali, ad esempio, carcinoma del colon-retto e della mammella, della prostata, del testicolo, dell'ovaio, neoplasie del sistema nervoso centrale, del sistema emolinfopoietico.

La determinazione qualitativa e quantitativa può essere effettuata mediante almeno una tecnica scelta dal gruppo che consiste in ELISA, RIA,

immunoistochimica rilevata con fluorocromi (immunofluorescenza) o con metodo enzimatico, Western Blot o mediante una combinazione di esse.

Per maggiore chiarezza il termine "anticorpi oligoclonali" indica un repertorio ristretto di anticorpi policlonali ottenuti in seguito ad un determinato numero di cicli di immunizzazione al termine del quale si otterranno delle caratteristiche di affinità e specificità assimilabili a quelle di un anticorpo monoclonale.

La presente invenzione verrà ora descritta a titolo illustrativo, ma non limitativo, secondo sue forme preferite di realizzazione, con particolare riferimento alle figure dei disegni allegati, in cui:

la figura 1 mostra i risultati del saggio Western Blot di identificazione della clasterina nucleare; nel pannello A l'anticorpo è stato generato contro un epitopo antigenico non glicosilato della catena α della clasterina, SEQ ID No 1; nel pannello B l'anticorpo è stato generato contro un epitopo antigenico non glicosilato della catena β della clasterina, SEQ ID No 2;

la figura 2 mostra i risultati del saggio Western Blot di identificazione della clasterina citoplasmatica glicosilata; nel pannello A



l'anticorpo è stato generato contro un epitopo antigenico glicosilato della catena β della clasterina, SEQ ID No 2; nel pannello B l'anticorpo è stato generato contro un epitopo antigenico della catena β della clasterina, SEQ ID No 3; nel pannello C l'anticorpo è stato generato contro un epitopo antigenico della catena α della clasterina, SEQ ID No 4;

la figura 3 mostra i risultati del saggio ELISA per l'identificazione della clasterina secreta e nucleare nel tessuto tumorale e nella corrispettiva parte sana; nel pannello A è mostrata la rilevazione ottenuta mediante l'anticorpo specifico per la clasterina nucleare non glicosilata, diretto contro l'epitopo antigenico SEQ ID No 1; nel pannello B è mostrata la rilevazione ottenuta mediante l'anticorpo specifico per la clasterina secreta glicosilata, diretto contro l'epitopo antigenico SEQ ID No 4;

la figura 4 mostra il diagramma che illustra i risultati del saggio ELISA concernenti la concentrazione di clasterina ($\mu\text{g}/\text{ml}$) rilasciata nel sopranatante di coltura dalle cellule della mucosa del colon normale e da cellule neoplastiche in coltura isolate ex vivo (numero di cellule 10×10^7) e dosata mediante saggio ELISA.

ESEMPIO 1: *Produzione degli anticorpi oligoclonali anticlasterina mediante immunizzazione.*

Per la produzione dell'anticorpo oligoclonale specifico anticlasterina è stata impiegata la tecnica dell'immunizzazione nota agli esperti del settore. La procedura consiste nell'immunizzare un coniglio o altro animale con un epitopo caratteristico della proteina target e gli anticorpi prodotti dai differenti cloni di plasmacellule saranno presenti nel siero dell'animale che rappresenta una fonte di anticorpi policlonali.

MATERIALI E METODI

Preparazione immunogeni: sintesi e purificazione

Sono state impiegate sequenze di epitopi antigeniche molto piccole appartenenti alla clasterina sintetizzate su fase solida e di lunghezza compresa tra 10 e 20 amminoacidi.

La sequenza amminoacidica della proteina clasterina umana è stata confrontata con la stessa sequenza murina (*Mus musculus*) e, mediante l'impiego di un algoritmo sviluppato da Kolaskar A. S. e Tongaonkar P.C. (1990) disponibile attraverso il programma Antigenic Peptide Prediction

(www.mifoundation.org), sono stati individuati i siti antigenici delle due sequenze.

Dopo avere individuato le sequenze contenenti un sito antigenico condivise tra uomo e topo (gli anticorpi possono essere così impiegati nel topo e nel ratto), sono state selezionate le sequenze potenzialmente suscettibili a glicosilazione. Sono stati individuati due probabili siti di glicosilazione della proteina che avrebbero determinato la discriminazione tra le due diverse isoforme ed è stata scelta la sequenza più corta per ottenere la massima specificità ed efficienza anticorpale, unitamente alla minima cross-reattività, ovvero il legame con le diverse forme glicosilate della stessa proteina clasterina. Infatti, l'immunizzazione eseguita con epitopi non glicosilati di ridotte dimensioni ha consentito di ottenere anticorpi specifici e selettivi per il riconoscimento della forma nucleare della clasterina (non glicosilata).

L'identificazione delle diverse isoforme della clasterina in un estratto proteico da tessuto tramite Western Blot è stato possibile denaturando la proteina.

Le sequenze amminoacidiche, selezionate e identificate, sono le seguenti: QFNWVSRLANLTQGEDQK (SEQ ID No 1), che rappresenta un peptide antigenico non glicosilato della catena α utilizzato per l'identificazione della forma nucleare della clasterina; TKLKELPGVCNETMMALWEE (SEQ ID No 2), che rappresenta il peptide antigenico non glicosilato appartenente alla catena β utilizzato per la produzione del secondo anticorpo per l'identificazione della forma nucleare comprendente anche il sito di glicosilazione 103 (sottolineato).

Detti peptidi sono stati resi immunogeni coniugandoli con una proteina carrier, in particolare con l'albumina sierica bovina (BSA), comunemente impiegata per la sua stabilità e solubilità nel plasma. Per la coniugazione è stato impiegato un kit commerciale "Inject[®]Immunogen EDC Conjugation kit" della Pierce (Rockford, IL, US) secondo le istruzioni del produttore.

Il modello animale è stato determinato dall'alta omologia e conservazione della sequenza interspecie.

Sono stati scelti tre epitopi per l'immunizzazione dei conigli a causa della scarsa immunogenicità dell'antigene, nonostante la



coniugazione con BSA e la somministrazione in adiuvante di Freund completo. Più specificatamente, sono stati impiegati i seguenti tre epitopi : TKL**KELPGVCNETMMALWEE** (SEQ ID No 2) che rappresenta il peptide antigenico glicosilato appartenente alla catena β utilizzato per la produzione del secondo anticorpo per l'identificazione della forma nucleare comprendente anche il sito di glicosilazione 103 (sottolineato); TNEERK**TLLSNLEEK** (SEQ ID No 3) che rappresenta il peptide appartenente alla catena β utilizzato per l'identificazione della forma citoplasmatica; METVAE**KALQEYRKK** (SEQ ID No 4) che rappresenta il peptide antigenico appartenente alla catena α utilizzato per l'identificazione della forma citoplasmatica.

Sono stati inoculati 150 μ l di ciascuna delle soluzioni di immunogeno così ottenute contenenti il coniugato epitopo antigenico-proteina carrier per via sottocutanea sul dorso del coniglio in adiuvante Freund completo. Sono stati immunizzati tre conigli per peptide con peptidi semplici o glicosilati sintetizzati in fase solida; i conigli sono stati immunizzati secondo la tabella suggerita da Corning Hazleton Virginia (Vienna, VA). In particolare i due siti di glicosilazione scelti come epitopi per la

produzione degli anticorpi sono stati inoculati nel coniglio sia individualmente, sia in miscela in un rapporto stechiometrico 1:1.

Quindi è stata effettuata l'immunizzazione con un epitopo appartenente alla catena β della clasterina che non presenta siti di glicosilazione per ottenere anticorpi in grado di riconoscere tutte le isoforme.

L'utilizzo di siti di glicosilazione della proteina ha permesso di discriminare sia in Western Blot sia in ELISA l'isoforma citoplasmatica marcatore dell'aggressività tumorale e del suo relativo potenziale metastatico.

Dopo sette giorni dalla prima somministrazione dei peptidi immunogeni l'operazione è stata ripetuta negli stessi animali per sostenere e aumentare la specificità della risposta immune. L'operazione è stata poi ripetuta ogni sette giorni per un totale di sei volte.

La risposta immune è stata monitorata a partire dal terzo ciclo di immunizzazione attraverso la tecnica dell'ELISA capace di misurare l'entità della risposta anticorpale nel siero del coniglio. Il siero del coniglio è stato ottenuto tramite il prelievo di 5 ml di sangue dalla vena auricolare dell'animale.

Come bianco per il test ELISA è stato utilizzato il siero preimmune del coniglio, prelevato antecedentemente alla prima immunizzazione.

Il sangue è stato raccolto dopo la quarta, quinta e sesta immunizzazione per il test di affinità e specificità.

Dopo la quinta e la sesta immunizzazione gli anticorpi presenti nei sieri dei conigli sono stati precipitati con una soluzione satura di ammonio sulfato e quindi purificate tramite cromatografia per affinità sfruttando il legame tra Proteina A immobilizzata su biglie di agarosio (SIGMA) e le IgG presenti nell'antisiero. Le IgG presenti sono state eluite con un tampone 0,05 M Na₂HPO₄, 0,025 M acido citrico a pH 3.

Screening anti-sieri e test di specificità

La risposta immune è stata monitorata a partire dal terzo ciclo di immunizzazione tramite ELISA.

Il sangue per il test e per la produzione di anticorpi proveniente da tre conigli diversi è stato valutato per l'idoneità al saggio ELISA accertando il titolo di antisiero a varie diluizioni nel range di massimo legame del dosaggio, la sensibilità e la specificità. Dopo la sesta immunizzazione sono stati condotti i test illustrati di seguito.



Per i test di legame a varie diluizioni, i diversi anticorpi sono stati incubati sia con terreno di coltura completo di controllo sia con terreno addizionato di siero in presenza di quantità note di peptide. Su un grafico è stata riportata la percentuale di peptide legato contro la diluizione dell'antisiero. E' stata stimata la diluizione dell'antisiero che legava tra il 30 e il 40% del peptide totale aggiunto.

Utilizzando l'antisiero alla diluizione appropriata è stata dosata una curva standard di riferimento che si estendeva da 0,03 a 300000 ng/ml per stimare la sensibilità.

E' stata testata la cross-reattività con altre lipoproteine: ApoE, Apo AI e della proteina di trasporto dell'immunogeno (BSA) alle concentrazioni comprese tra 0,50 a 300000 ng/ml.

La percentuale di cross-reattività è stata calcolata dal rapporto molare o di massa della concentrazione stimata al 50% di peptide clasterina rispetto a quella del composto del test. I risultati sono mostrati nella tabella 1.

Tabella 1

	Anticorpo SEQ ID No 1	Anticorpo SEQ ID No 2	Anticorpo SEQ ID No 2	Anticorpo SEQ ID No 3	Anticorpo SEQ ID No 4
Clasterina	100	100	100	100	100
ApoAI	<0,001	<0,001	<0,001	<0,004	<0,006
ApoE	<0,001	<0,002	<0,008	<0,002	<0,003
BSA	<0,009	<0,008	<0,01	<0,007	<0,01

Sono stati scelti quindi gli antisieri con più alto titolo e minore cross-reattività.

Gli anticorpi oligoclonali individuati dopo i sei cicli di immunizzazione hanno consentito di poter studiare i profili di espressione della proteina clasterina in estratti proteici provenienti da biopsie di tessuti sia umani sia murini.

Lo studio dell'espressione in lisati contenenti estratti proteici da tessuti umani e murini ha consentito di analizzare l'espressione della proteina sia qualitivamente sia quantitivamente.

Tramite la tecnica nota del Western Blot (diluizione 1:1000), l'anticorpo oligoclonale è capace di riconoscere la proteina clasterina/apoJ nucleare con un'affinità quasi esclusiva per questa

isoforma. Infatti, vengono identificate una banda di 55 kDa per la proteina nucleare non glicosilata (Burkey et al., 1991; Wong et al., 1993; Lakins et al., 1998; Leskov et al., 2003) e una banda di 80 kDa che rappresenta il precursore non glicosilato (oloproteina) della proteina sia nell'uomo sia nel topo. Ciò dimostra che l'anticorpo non cross-reagisce con altre proteine ed è quindi altamente specifico.

RISULTATI

Per quanto concerne la rilevazione dell'isoforma di clasterina non glicosilata nucleare, gli anticorpi contro gli epitopi SEQ ID No 1 e SEQ ID No 2 sono stati testati mediante Western Blot denaturante per verificare la capacità di evidenziare, in un lisato proteico, il peso molecolare corrispondente alle diverse isoforme di clasterina.

Infatti, nella mucosa sana del colon, è stata evidenziata la presenza della clasterina nucleare coinvolta nella regolazione della proliferazione cellulare e nell'induzione di apoptosi. È stato preparato un lisato proteico totale di cellule della mucosa sana del colon. Dopo aver determinato, mediante saggio Bradford, il quantitativo proteico rispetto ad una curva standard (BSA), sono stati

caricati 15 µg di estratto proteico totale in un gel di poliacrilamide denaturante.

Dall'analisi mediante Western Blot i due anticorpi diretti verso la forma non glicosilata hanno mostrato un'alta affinità per la forma nucleare non glicosilata (50-55 kDa).

Nella figura 1 è mostrato il Western Blot di identificazione della clasterina nucleare mediante anticorpi ad alta affinità per l'isoforma non glicosilata ottenuti mediante un booster dopo 5 immunizzazioni in coniglio. Con il termine "booster" si indica la fase di crescita esponenziale della risposta immunologica indotta nell'animale da un antigene.

I livelli di espressione di clasterina citoplasmatica sono notevolmente elevati in carcinomi aggressivi e metastatici del colon.

Sono stati preparati estratti proteici totali da tumori del colon provenienti da reperti operatori. In particolare, sono stati analizzati 15 µg di proteine totali mediante Western Blot. I campioni caricati in triplicato sono stati analizzati con i tre anticorpi prodotti verso l'isoforma citoplasmatica glicosilata (epitopi SEQ ID No 2, 3, 4). Nella figura 2 sono mostrate le immagini

dell'analisi mediante Western Blot con ognuno degli anticorpi ottenuti. Come mostrato nella figura, dopo la rilevazione con i diversi anticorpi ad alta affinità, è stata evidenziata una banda a 40 kDa corrispondente al peso molecolare della forma glicosilata della clasterina.

Sono stati eseguiti test di specificità durante l'incubazione con l'anticorpo primario. I singoli peptidi sono stati aggiunti in quantità scalari durante l'incubazione con l'anticorpo primario prodotto. I peptidi sono stati usati per competere per il legame tra la clastrina presente nell'estratto e anticorpo facendo scomparire il segnale del Western Blot, dimostrando la specificità del legame già avvalorata dal riconoscimento della proteina di peso molecolare pari a 40 kDa.

Nella figura 3 è evidenziata la specificità per la diverse isoforme di clasterina e dall'analisi della figura si evince come l'espressione delle diverse isoforme sia modulata durante la tumorigenesi del colon. Nel tessuto tumorale (T) scompare l'isoforma di controllo della proliferazione che è localizzata nel nucleo delle cellule della mucosa sana (S). Al contrario, nel tumore aumenta l'isoforma



citoplasmatica implicata nel rimaneggiamento della membrana e nella motilità cellulare.

Questo tipo di saggio permetterebbe di avere delle informazioni di tipo prognostico per il paziente. Infatti, è stato correlato l'aumento di clasterina citoplasmatica in pazienti affetti da tumori metastatici del colon ad un follow up di recidiva metastatica del tumore.

Tale indagine potrebbe fornire informazioni sulla potenziale formazione di recidive e metastasi del paziente.

ESEMPIO 2: *Metodologia ELISA per la determinazione quali-quantitativa della clasterina nei liquidi biologici*

La determinazione quantitativa nei liquidi biologici (sangue, liquido seminale, urine, feci, liquido pleurico e ascitico, liquor) della clasterina/ApoJ secondo la presente invenzione è stata sviluppata mediante un adattamento delle tecniche ELISA e RIA per neoplasie di piccole dimensioni.

Il metodo ELISA prevede l'uso di due anticorpi diretti contro la proteina clasterina glicosilata secreta nei liquidi biologici ed è applicato con successo per la determinazione quantitativa assoluta

e non relativa anche di minime variazioni di clasterina nei liquidi biologici.

Un miglioramento significativo è stato raggiunto mediante i dosaggi immunologici omogenei, che non richiedono una separazione fisica dell'antigene da quello non legato e quindi facilitano l'automazione e velocizzano lo screening.

La clasterina si trova in individui sani alla concentrazione di $100 \pm 42 \mu\text{g}/\text{ml}$.

Il metodo della presente invenzione prevede un'ulteriore estensione ad un dosaggio RIA che permetta la rivelazione di clasterina presente nei liquidi biologici in relazione alla grandezza della massa tumorale e all'aggressività del tumore; infatti il dosaggio RIA è molto sensibile ed è quindi indicato per valutare le differenze tra i livelli di concentrazione di clasterina normali o lievemente aumentati a causa di neoplasie di piccole dimensioni o non aggressive.

MATERIALI E METODI

Curva standard

Per la costruzione della curva standard ciascun peptide utilizzato per la generazione dei diversi anticorpi è stato legato a molecole di BSA ed

immunoadsorbito in diluizioni scalari in piastre da 96 pozzetti.

Per la curva di standardizzazione è stata utilizzata ciascuna sequenza peptidica, sintetizzata con il metodo a fase solida, usata per la generazione dell'anticorpo oligoclonale anti-clasterina secreta.

La curva di riferimento quantitativa è stata effettuata legando il peptide non marcato ad una molecola carrier di cui si conosce la capacità legante. E' stata quindi utilizzata albumina cationica (tutti i gruppi COOH trasformati in NH₂, PIERCE). La coniugazione del peptide al carrier avviene con carbodiimmide o glutaraldeide (un NH₂ della proteina con una molecola di peptide).

I gruppi NH₂ possono essere determinati con un metodo colorimetrico. La determinazione degli NH₂ liberi sulla proteina, prima e dopo la coniugazione con il peptide, rende nota la quantità di molecole di peptide coniugate per mole di carrier.

La curva standard è stata ottenuta con quantità crescenti, da 0 alla quantità saturante l'aliquota di anticorpo impiegata, di composto carrier-peptide in piastra e con quantità costante di anticorpo.

Le reazioni caratterizzate dalla stessa quantità di anticorpo in campioni contenenti la

proteina o il peptide libero daranno un'intensità di reazione che potrà essere riportata sulla curva di riferimento per la quantizzazione.



E' stata quindi preparata la curva standard, necessaria per la determinazione della concentrazione di clasterina nei campioni, piastrando 50 μ l di soluzione per pozzetto in TBS + 0,02% BSA + 0,5 % Tween-20.

ELISA

Nella fase di rivestimento delle piastre l'anticorpo anti-clasterina secondo la presente invenzione contro l'epitopo è stato diluito in un tampone di rivestimento (0,05 M tampone carbonato, pH 9,6) + 0,1% NaN₃ alla concentrazione di 0,5 μ g/ml e lasciato incubare in piastre da 96 pozzetti (50 μ l/pozzetto) per due ore a 37°C e per una notte a 4°C.

Al termine dell'incubazione l'anticorpo non legato è stato rimosso mediante lavaggio con TBS (Tris Buffered Saline) + 0,5 % Tween 20 ed in ciascun pozzetto sono stati aggiunti 200 μ l di BSA 1% in tampone di rivestimento per 30 minuti a 37°C.

Le piastre sono state lavate in TBS (Tris Buffered Saline) + 0,5% Tween-20.

I campioni di siero dei pazienti sono stati piastrati in tre diverse diluizioni (50 μ l/pozzetto). Tutti i punti sperimentali sono stati eseguiti in triplicato.

Le piastre sono state incubate per 4 ore a 37°C (oppure per una notte a 4°C) ed in seguito lavate in TBS + 0,5 Tween-20.

Un secondo anticorpo anti-clasterina è stato diluito 1:200 in TBS + 0,1% BSA + 0,05% Tween-20 + 2mM di MgCl₂; 50 μ l della diluizione sono stati aggiunti in ogni pozzetto e lasciati in incubazione per 4 ore a 37°C. L'anticorpo non legato è stato rimosso mediante lavaggi in TBS + 0,5% Tween-20.

Reazione con gli anticorpi specifici HRP coniugati

Le piastre sono state incubate per 1 ora a temperatura ambiente con 100 μ l di IgG di pecora anti-coniglio coniugate con la perossidasi di rafano diluite 1:10.000 in 1% BSA/TBS.

Dopo l'incubazione le piastre sono state nuovamente lavate, l'anticorpo è stato visualizzato tramite l'aggiunta di 100 μ l per pozzetto di soluzione di sviluppo e una successiva incubazione per 2 ore al buio a temperatura ambiente; la soluzione di sviluppo è stata preparata combinando 6

µl di H₂O₂, 360 µl di tetrametilbenzidina (3 mg/ml) dissolta in acetone, 5,64 ml di 0,1 M acido citrico, e 4,36 ml di 0,2 M Na₂HPO₄.

La reazione è stata interrotta tramite l'aggiunta di 100 µl di H₂SO₄ al 5,3% e la densità ottica è stata letta a 492 nm.

RISULTATI

Mediante metodica ELISA validata come descritto precedentemente è stata valutata la capacità di rilevare in un fluido biologico piccole quantità di proteina clasterina glicosilata aumentata nelle cellule tumorali e rilasciata a livello extracellulare, sia nel lume intestinale sia nel sangue.

Nella figura 4 sono illustrati i risultati ottenuti mediante il saggio ed è possibile apprezzare un evidente e significativo aumento della proteina nel sopranatante di coltura delle cellule tumorali isolate ex vivo, rispetto alle cellule della mucosa sana dello stesso paziente. La specificità del test è fornita proprio dal confronto della presenza della proteina rilasciata dalle cellule sane e neoplastiche dello stesso paziente. Il terreno di coltura contenente gli stessi nutrienti esogeni è stato

utilizzato come normalizzatore. I risultati mostrano che il test è specifico.

In particolare, nella figura 4 è mostrato il diagramma che illustra i risultati del saggio ELISA concernenti la concentrazione di clasterina ($\mu\text{g}/\text{ml}$) rilasciata nel sopranatante di coltura dalle cellule della mucosa del colon normale e da cellule neoplastiche in coltura isolate ex vivo. E' stato impiegato il terreno di coltura completo utilizzato come controllo. Le cellule della mucosa sana (10×10^7 cellule) e le cellule neoplastiche del colon (10×10^7 cellule) sono state incubate per 2 giorni a 37°C in terreno completo ed il sopranatante di coltura è stato dosato con saggio ELISA.

Il kit diagnostico secondo la presente invenzione si propone quindi di determinare quantitativamente in modo assoluto e non relativo, specifico e selettivo, il livello di clasterina nei liquidi biologici, permettendo quindi una diagnosi tempestiva e non invasiva di eventuali neoplasie.

Nel caso specifico del carcinoma al colon retto, l'aumento dell'espressione della clasterina glicosilata nel citoplasma è stata correlata all'aggressività del tumore e al suo potenziale metastatico, per cui detto kit può essere impiegato

anche per la predizione della stadiazione clinica e del grado di malignità.

BIBLIOGRAFIA

- Aronow BJ, Lund DS, Brown TL, Harmony JAK and Witte DP. (1993). Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90, 725-729.
- Bettuzzi S, Scorcioni F, Astancolle S, Davalli P, Scaltriti M and Corti A. (2002). Oncogene 21, 4328-4334.
- Burkey BF, DeSilva HV and Harmony JA. (1991). J. Lipid Res., 32, 1039-1048.
- Fratelli M, Galli G, Minto M and Pasinetti GM. (1996). Biochim. Biophys. Acta 1311, 71-76.
- Ho SM, Leav I, Ghatak S, Merk F, Jagannathan VS and Mallory K. (1998). Am. J. Pathol., 153, 131-139.
- Humphreys DT, Carver JA, Easterbroock-Smith SB and Wilson MR. (1999). J. Biol. Chem., 274, 6875-6881.
- Lakins J, Bennett SA, Chen JH, Arnold JM, Morrissey C, Wong P, O 'Sullivan J and Tenniswood M. (1998). J. Biol. Chem., 273, 27887-27895.
- Leskov KS, Klokov DY, Li J, Kinsella TJ and Boothman DA. (2003). J. Biol. Chem., 278, 11590-11600.

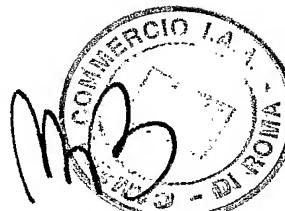


SA
C
G
B
D
P
A
R
Z
A
N
G
O
M
E
R
I
T
Y

- Morrissey C, Lakins J, Moquin A, Hussain M, Tenniswood. (2001). J.Biochem.Biophys.Metods, 48,13-21.
- Murphy BF, Kirszbaum L, Walker ID and D'Apice AJ.(1988). J. Clin. Invest., 81, 1858-1864.
- O'Sullivan J, Whyte L, Drake J and Tenniswood M.(2003). Cell Death Differ. ,10, 914-927.
- Pucci S, Bonanno E, Pichiorri F, Angeloni C, Spagnoli L. (2004). Oncogene, advance on line publication, 1-7.
- Redondo M, Villar E, Torres-Munoz J, Tellez T, Morell M and Petito CK.(2000). Am. J. Pathol., 157, 393-399.
- Wong P, Pineault J, Lakins J, Taillefer D, Leger J, Wang C and Tenniswood M.(1993).J. Biol. Chem., 268, 5021-5031.
- Zhou W, Janulis L, Park II and Lee C.(2002). Life Sci., 72.
- Domanda di brevetto greco, No GR20020100196.

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Serena Gitto
(N° d'iscr. 962B)

Serena Gitto



RIVENDICAZIONI

RM 2004 A 000098

1. Anticorpi oligoclonali in grado di riconoscere e legare in maniera selettiva e specifica l'epitopo antigenico di almeno un'isoforma della clasterina, detto epitopo essendo caratterizzato da una lunghezza della sequenza amminoacidica compresa tra 10 e 20 amminoacidi.

2. Anticorpi oligoclonali secondo la rivendicazione 1, in cui detta almeno un'isoforma è citoplasmatica glicosilata o nucleare non glicosilata.

3. Anticorpi oligoclonali secondo ognuna delle rivendicazioni 1 e 2, in cui l'epitopo antigenico di detta isoforma nucleare non glicosilata comprende una sequenza amminoacidica scelta dal gruppo che consiste in:

QFNWVSRLANLTQGEDQK (SEQ ID No 1);

TKLKELPGVCNETMMALWEE (SEQ ID No 2);

e loro derivati.

4. Anticorpi oligoclonali secondo ognuna delle rivendicazioni 1 e 2, in cui l'epitopo antigenico di detta isoforma citoplasmatica glicosilata comprende una sequenza amminoacidica scelta dal gruppo che consiste in:

TKLKELPGVCNETMMALWEE (SEQ ID No 2);

TNEERKTLLSNLEEAK (SEQ ID No 3);

METVAEKALQEYRKK (SEQ ID No 4);

e loro derivati.

5. Anticorpi oligoclonali secondo ognuna delle rivendicazioni da 1 a 4, in cui detti anticorpi sono marcati.

6. Anticorpi oligoclonali secondo la rivendicazione 5, in cui gli anticorpi sono marcati con un fluorocromo, un isotopo radioattivo, un enzima, biotina o una sostanza chemioluminescente.

7. Anticorpi oligoclonali secondo la rivendicazione 6, in cui il fluorocromo è scelto dal gruppo che consiste in fluoresceina, ficoeritrina, rodamina, texas red, cumarina.

8. Anticorpi oligoclonali secondo la rivendicazione 6, in cui l'isotopo radioattivo è il ^{14}C o il ^3H .

9. Anticorpi oligoclonali secondo la rivendicazione 6, in cui la sostanza chemioluminescente è la luciferina.

10. Anticorpi oligoclonali secondo la rivendicazione 6, in cui l'enzima è scelto dal gruppo che consiste in perossidasi di rafano (HRP), fosfatasi alcalina.

11. Epitopi antigenici appartenenti ad almeno un'isoforma della clasterina comprendenti almeno una sequenza amminoacidica scelta dal gruppo che consiste in:

QFNWVSRLANLTQGEDQK (SEQ ID No 1);

TKLKELPGVCNETMMALWEE (SEQ ID No 2);

TNEERKTLLSNLEEK (SEQ ID No 3);

METVAEKALQEYRKK (SEQ ID No 4);

e loro derivati.

12. Metodo per la preparazione degli anticorpi oligoclonali, come definiti nelle rivendicazioni da 1 a 10, comprendente le seguenti fasi:

- a) sintesi in fase solida di almeno uno degli epitopi antigenici come definiti nella rivendicazione 11;
- b) coniugazione di detto almeno un epitopo antigenico con un carrier proteico atto a rendere immunogeno detto epitopo;
- c) immunizzazione dell'animale con detto epitopo reso immunogeno, in adiuvante di Freund completo;
- d) prelievo del siero da detto animale e purificazione degli anticorpi oligoclonali.

13. Metodo secondo la rivendicazione 12, in cui detto carrier proteico è l'albumina di siero bovina.



14. Metodo secondo ognuna delle rivendicazioni 12 e 13, in cui detto animale è il coniglio.

15. Metodo immunologico per la rivelazione dei livelli di clasterina in un campione biologico per la diagnosi di neoplasie e per la predizione del loro grado di malignità comprendente le seguenti fasi:

a) estrazione delle proteine da detto campione biologico;

b) incubazione in opportune condizioni di detto estratto proteico con almeno un anticorpo oligoclonale come definito nelle rivendicazioni da 1 a 10, in maniera da formare un complesso antigene-anticorpo; e

c) rivelazione qualitativa e quantitativa di detto complesso antigene-anticorpo.

16. Metodo immunologico secondo la rivendicazione 15, in cui detto campione biologico è scelto dal gruppo che consiste in sangue, feci, liquido seminale, liquido pleurico, liquido ascetico, urine, liquor.

17. Metodo immunologico secondo ognuna delle rivendicazioni 15 e 16, in cui le neoplasie sono scelte dal gruppo che consiste in carcinoma del colon-retto, della mammella, della prostata, del testicolo, dell'ovaio, neoplasie del sistema nervoso

centrale, del sistema emolinfopoietico.

18. Metodo immunologico secondo ognuna delle rivendicazioni da 15 a 17, in cui la rivelazione della fase c) avviene mediante almeno una delle tecniche scelte dal gruppo che consiste in ELISA, Western Blot, RIA, immunoistochimica.

19. Kit diagnostico per la diagnosi di neoplasie e per la predizione del loro grado di malignità comprendente almeno uno degli anticorpi oligoclonali come definiti nelle rivendicazioni da 1 a 10.

20. Kit diagnostico secondo la rivendicazione 19, in cui le neoplasie sono scelte dal gruppo che consiste in carcinoma del colon-retto, della mammella, della prostata, del testicolo, dell'ovaio, neoplasie del sistema nervoso centrale, del sistema emolinfopoietico.

21. Uso di almeno uno degli anticorpi oligoclonali come definiti nelle rivendicazioni da 1 a 10, per la determinazione qualitativa e quantitativa dei livelli di almeno un'isoforma di clasterina in un campione biologico per la diagnosi di neoplasie e per la predizione del loro grado di malignità.

22. Uso secondo la rivendicazione 21, in cui la determinazione qualitativa e quantitativa viene effettuata mediante almeno una tecnica scelta dal

gruppo che consiste in ELISA, RIA, immunoistochimica, Western Blot.

23. Uso secondo ognuna delle rivendicazioni 21 e 22, in cui le neoplasie sono scelte dal gruppo che consiste in carcinoma del colon-retto, della mammella, della prostata, del testicolo, dell'ovaio, neoplasie del sistema nervoso centrale e del sistema emolinfopoietico.

24. Uso secondo ognuna delle rivendicazioni da 21 a 23, in cui detto campione biologico è scelto dal gruppo che consiste in sangue, feci, liquido seminale, liquido pleurico, liquido ascetico, urine, liquor.

Roma, 25 FEB. 2004

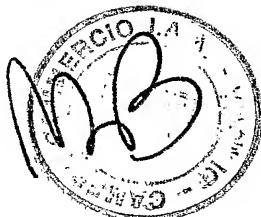
p.p. : Università degli Studi di Roma "Tor Vergata"

ING. BARZANÒ & ZANARDO ROMA S.p.A.

SG/IC

*UN MANDATARIO
per se e per gli altri*
Serena Gitto
(N° d'iscr. 962 B)

Serena Gitto



1/2

RM 2004 A 000098
B

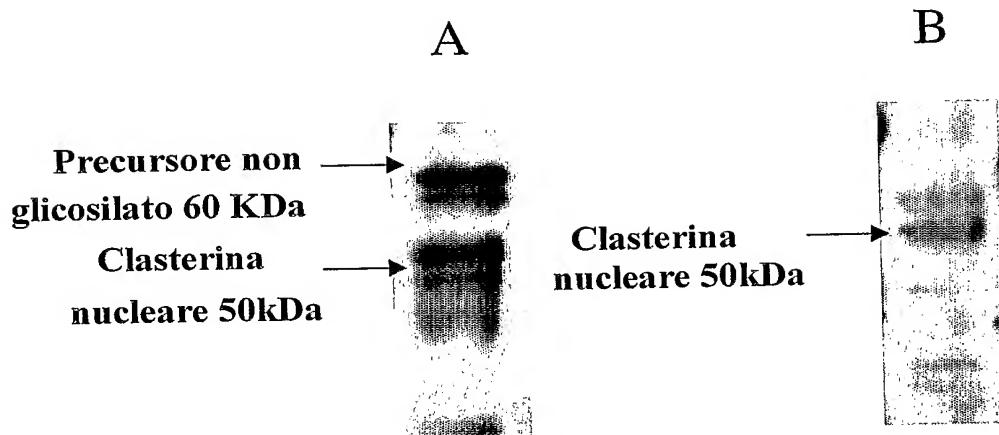


Fig. 1

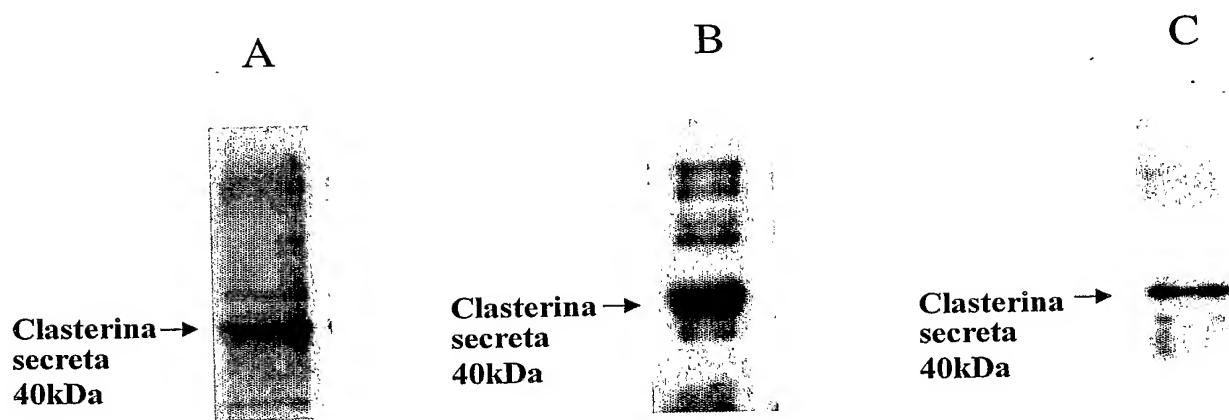


Fig. 2

**UN MANDATARIO
per se e per gli altri**
Serena Gitto
(N° d'iscr. 962 B)

p.p.: Università degli Studi di Roma “Tor Vergata”
Ing. Barzanò & Zanardo Roma S.p.A.

Serene Goto

2/2

Feb 2004 A 000098

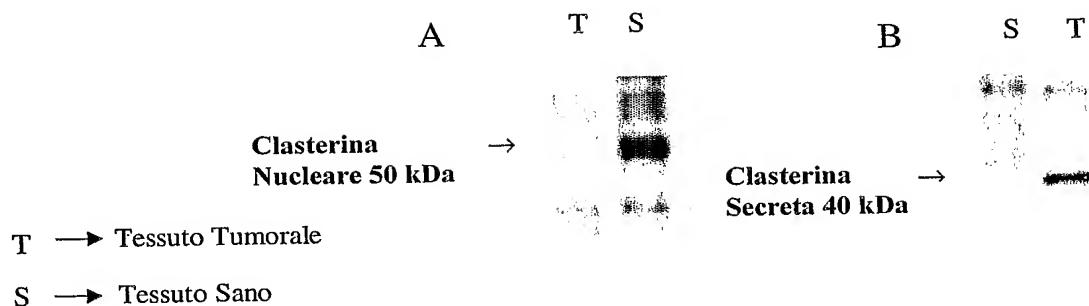


Fig. 3

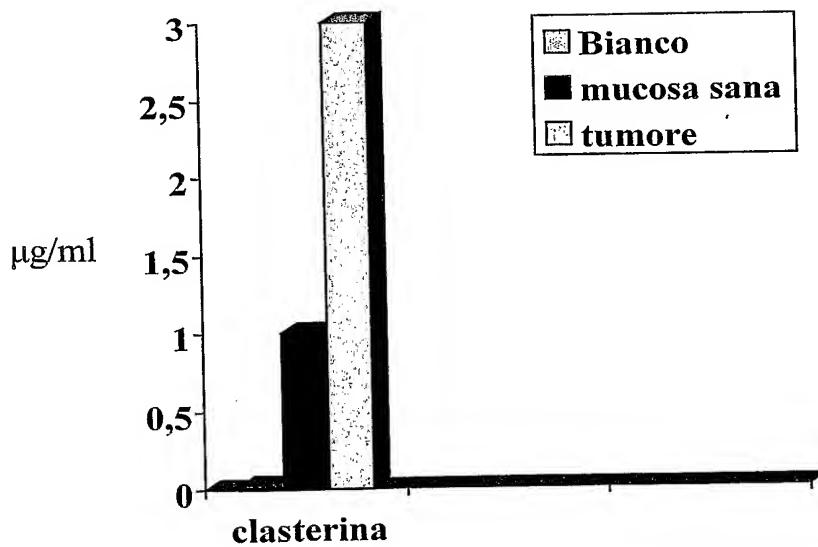


Fig. 4

UN MANDATARIO
per se e per gli altri
Serena Gitto
(N° d'iscr. 962 B)

Serena Gitto

